

DOCKET NO.: 217365US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Selim ARACTINGI et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR00/01670

INTERNATIONAL FILING DATE: June 16, 2000

FOR: COMPOSITIONS CONTAINING SOLUBLE FORMS OF HLA-G IN THE TREATMENT
OF INFLAMMATORY SKIN PATHOLOGIES

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that
the applicant claims as priority:

COUNTRY

France

APPLICATION NO

99 07736

DAY/MONTH/YEAR

18 June 1999

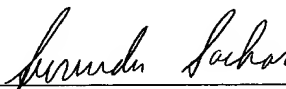
Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the
International Bureau in PCT Application No. PCT/FR00/01670.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)


Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423





FR 00/1670

EJU

REC'D 08 SEP 2000	
WIPO	PCT

#2

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 14 AOUT 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', enclosed within a large, loopy oval stroke.

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **18 JUIN 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9907736**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **18 JUIN 1999**

1 **NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

CABINET ORES
6 avenue de Messine
75008 PARIS

n° du pouvoir permanent **BLOcp263/55FR** références du correspondant **BLOcp263/55FR** téléphone

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**UTILISATION DE COMPOSITIONS CONTENANT DES FORMES SOLUBLES D'HLA-G DANS LE
TRAITEMENT DE PATHOLOGIES INFLAMMATOIRES DE LA PEAU, ET LEUR PROCÉDÉ
D'OBTENTION.**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

Forme juridique

Etablissement public

Nationalité (s) **française**

Adresse (s) complète (s)

31-33 rue de la Fédération, 75015 PARIS

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Béatrice ORES
n° 92-4046

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9907736

TITRE DE L'INVENTION : UTILISATION DE COMPOSITIONS CONTENANT DES FORMES SOLUBLES D'HLA-G DANS LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES INFLAMMATOIRES DE LA PEAU, ET LEUR PROCÉDE D'OBTENTION.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES

6 avenue de Messine
75008 PARIS (FRANCE)

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

ARACTINGI Selim

8 rue Saint Simon, 75007 PARIS (FRANCE)

CAROSELLA Edgardo Delfino

23 rue George Sand, 75016 PARIS (FRANCE)

DAUSSET Jean

9 rue Villersexel, 75007 PARIS (FRANCE)

KHALIL DAHER Iman

25 avenue des Antes, 94150 RUNGIS (FRANCE)

MOREAU Philippe

8 rue Bougainville, 91170 VIRY-CHATILLON (FRANCE)

PAUL Pascale

29 rue de la Grange aux Belles, 75010 PARIS (FRANCE)

ROUAS-FREISS Nathalie

44 Boulevard Arago, 75013 PARIS (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du demandeur (s) ou du mandataire

Le 18 juin 1999,

Béatrice ORES
n° 92-4046

La présente invention est relative à l'utilisation de compositions contenant des formes solubles d'HLA-G dans le traitement de pathologies de la peau et notamment des dermatoses inflammatoires, au procédé d'obtention desdites formes solubles d'HLA-G, ainsi qu'aux anticorps dirigés contre lesdites formes solubles.

5 Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), se divisent en plusieurs classes, les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) qui présentent 3 domaines globulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), et dont le domaine $\alpha 3$ est associé à la $\beta 2$ microglobuline, les antigènes de classe II (HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR) et les antigènes de classe III (complément).

10 Les antigènes de classe I comprennent, outre les antigènes précités, d'autres antigènes, dits antigènes de classe I non classiques, et notamment les antigènes HLA-E, HLA-F et HLA-G ; ce dernier, en particulier, est exprimé par les trophoblastes extravilleux du placenta humain normal et les cellules épithéliales thymiques.

15 La séquence du gène HLA-G (gène HLA-6.0) a été décrite par GERAGHTY et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149) : il comprend 4396 paires de bases et présente une organisation intron/exon homologue à celle des gènes HLA-A, -B et -C. De manière plus précise, ce gène comprend 8 exons, 7 introns et une extrémité non traduite 3' ; les 8 exons correspondent respectivement à : exon 1 :
 20 séquence signal, exon 2 : domaine extracellulaire $\alpha 1$, exon 3 : domaine extracellulaire $\alpha 2$, exon 4 : domaine extracellulaire $\alpha 3$, exon 5 : région transmembranaire, exon 6 : domaine cytoplasmique I, exon 7 : domaine cytoplasmique II (non traduit), exon 8 : domaine cytoplasmique III (non traduit) et région 3' non traduite (GERAGHTY et al., précité; ELLIS et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735 ; KIRSZENBAUM M. et al.,
 25 *Oncogeny of hematopoiesis. Aplastic anemia* Eds. E. Gluckman, L. Coulombel, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd). Toutefois le gène HLA-G diffère des autres gènes de classe I, en ce que le codon de terminaison de traduction, en phase, est localisé au niveau du deuxième codon de l'exon 6 ; en conséquence, la région cytoplasmique de la protéine codée par ce gène HLA-6.0 est considérablement plus courte
 30 que celle des régions cytoplasmiques des protéines HLA-A, -B et -C.

Ces antigènes HLA-G sont essentiellement exprimés par les cellules cytotrophoblastiques du placenta et sont considérés comme jouant un rôle dans la

protection du fœtus (absence de rejet par la mère). En outre, dans la mesure où l'antigène HLA-G est monomorphique, il peut également être impliqué dans la croissance ou la fonction des cellules placentaires (KOVATS et al., *Science*, 1990, 248, 220-223).

5 D'autres recherches concernant cet antigène non classique de classe I (ISHITANI et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 3947-3951) ont montré que le transcrit primaire du gène HLA-G peut être épissé de plusieurs manières et produit au moins 3 ARNm matures distincts : le transcrit primaire d'HLA-G fournit une copie complète (G1) de 1 200 pb, un fragment de 900 pb (G2) et un fragment de 600 pb
10 (G3).

Le transcrit G1 ne comprend pas l'exon 7 et correspond à la séquence décrite par ELLIS et al. (précité), c'est-à-dire qu'il code une protéine qui comprend une séquence leader, trois domaines externes, une région transmembranaire et une séquence cytoplasmique. L'ARNm G2 ne comprend pas l'exon 3, c'est-à-dire
15 qu'il code une protéine dans laquelle les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sont directement joints ; l'ARNm G3 ne contient ni l'exon 3, ni l'exon 4, c'est-à-dire qu'il code une protéine dans laquelle le domaine $\alpha 1$ et la séquence transmembranaire sont directement joints.

L'épissage qui prévaut pour l'obtention de l'antigène HLA-G2 entraîne la jonction d'une adénine (A) (provenant du domaine codant $\alpha 1$) avec une
20 séquence AC (issue du domaine codant $\alpha 3$), ce qui entraîne la création d'un codon AAC (asparagine) à la place du codon GAC (acide aspartique), rencontré au début de la séquence codant le domaine $\alpha 3$ dans HLA-G1.

L'épissage généré pour l'obtention de HLA-G3 n'entraîne pas la formation d'un nouveau codon dans la zone d'épissage.

25 Les Auteurs de cet article ont également analysé les différentes protéines exprimées : les 3 ARNm sont traduits en protéine dans la lignée cellulaire .221-G.

Certains des Inventeurs ont montré l'existence d'autres formes épissées d'ARNm d'HLA-G : le transcrit HLA-G4, qui n'inclut pas l'exon 4 ; le transcrit
30 HLA-G5, qui inclut l'intron 4, entre les exons 4 et 5, provoquant ainsi une modification du cadre de lecture, lors de la traduction de ce transcrit et en particulier l'apparition d'un codon stop, après l'acide aminé 21 de l'intron 4 ; et le transcrit HLA-

G6, possédant l'intron 4, mais ayant perdu l'exon 3 (KIRSZENBAUM M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 4209-4213 ; Demande Européenne EP 0 677 582 ; KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, 43, 237-241 ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, 43, 231-236) ; ils ont également montré que ces différents
5 transcrits sont exprimés dans plusieurs types de cellules humaines fœtales et adultes, notamment dans les lymphocytes (KIRSZENBAUM M. et al., *Human Immunol.*, 1995, précité ; MOREAU P. et al., *Human Immunol.* 1995, précité).

Il existe donc au moins 6 ARNms HLA-G différents qui codent potentiellement 6 isoformes protéiques d'HLA-G, dont 4 membranaires (HLA-G1, G2, G3 et G4) et 2 solubles (G5, G6).
10

La fonction immunomodulatrice exercée par ces molécules HLA-G a été décrite et les mécanismes de cette fonction ont été élucidés par la mise en évidence de leur interaction avec des récepteurs inhibiteurs de la lyse présents sur les cellules NK (récepteurs KIR) conduisant à une inhibition des fonctions cytotoxiques
15 de ces cellules.

Certains des Inventeurs ont également montré que certaines tumeurs expriment des molécules HLA-G, ce qui leur permet d'échapper à la surveillance immunitaire.

Les Inventeurs ont maintenant trouvé que des formes solubles d'HLA-G ont une action thérapeutique sur des états pathologiques inflammatoires de la peau.
20

On entend par état pathologique inflammatoire de la peau aussi bien des dermatoses que des pathologies des kératinocytes.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'une composition essentiellement constituée d'au moins une forme soluble d'HLA-G et d'au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable (excipient), pour la préparation d'un médicament pour le traitement des états pathologiques inflammatoires de la peau.
25

Les excipients associés à ladite composition sont adaptés à la voie d'administration souhaitée ; ils sont sélectionnés parmi les excipients connus de l'homme du métier.
30

Lesdites HLA-G solubles peuvent avantageusement être administrées par voie générale (voie orale, voie parentérale) ou en local (administration topique).

Dans ce dernier cas, ladite composition se présente sous la forme de
5 crème, de lotion, de liposomes ou de gel.

En effet, les Inventeurs ont maintenant trouvé que, de manière inattendue, des formes solubles d'HLA-G étant présentes habituellement dans les spécimens de peau psoriasique, une composition contenant une forme soluble d'HLA-G est particulièrement adaptée au traitement des états pathologiques de la peau, en particulier
10 du fait du rôle majeur des lymphocytes T dans cette maladie et de la capacité qu'a HLA-G à inhiber les fonctions T.

Conformément à l'invention, ladite composition est particulièrement adaptée au traitement du psoriasis. Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique fréquente observée chez 2 % des individus des populations caucasiennes. De
15 très nombreuses études physiopathologiques ont permis de montrer que cette maladie était liée à une infiltration de lymphocytes T, de sous-type Th1, produisant de l'interleukine 2 (IL-2) et de l'interféron γ (IFN γ) (Z. Bata-Csorgo et al. J. Investigative Dermatol., 1995, 89S-94S).

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite forme
20 soluble d'HLA-G est sélectionnée dans le groupe constitué par les isoformes d'HLA-G solubles comprenant au moins un domaine extracellulaire ($\alpha 1$, $\alpha 2$ ou $\alpha 3$) et les formes solubilisées d'HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 ou HLA-G4 (isoformes membranaires).

Lesdites HLA-G solubles comprennent au moins le domaine extra-
25 cellulaire $\alpha 1$.

Lesdites formes solubles sont en particulier produites soit dans un *baculovirus*, soit dans *E. coli*.

Pour ce qui concerne les formes membranaires, elles sont avantageusement exprimées dans des cellules eucaryotes, conformément au procédé décrit
30 dans la Demande Internationale PCT WO 98/37098, puis solubilisées par traitement de la membrane (agent décapant, tel que la papaïne) et purification convenable, par exemple sur colonne d'immunoaffinité avec des anticorps spécifiques.

On entend par forme soluble d'HLA-G aussi bien les HLA-G solubles (ne comportant pas de domaine transmembranaire) que les HLA-G membranaires solubilisées, par exemple dans les conditions précisées ci-dessus.

De préférence, ladite composition, administrée par voie topique, comprend entre 0,1 et 5 µg/ml, de préférence entre 0,5 et 2,5 µg/ml de forme soluble d'HLA-G.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite forme soluble d'HLA-G est associée à de l'IL-10 ; une telle composition présente une activité thérapeutique particulièrement significative vis-à-vis du psoriasis.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'une HLA-G soluble, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- co-infection de cellules d'insectes par un baculovirus contenant l'ADNc de la β_2M et un autre baculovirus contenant la chaîne α d'une isoforme soluble d'HLA-G ;
- culture des cellules d'insectes transfectées, et
- récolte des surnageants et purification de l'isoforme d'HLA-G soluble exprimée.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ladite isoforme d'HLA-G soluble est purifiée à l'aide d'un anticorps spécifique des isoformes d'HLA-G solubles.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, ledit anticorps est obtenu par immunisation de mammifères non-humains, tels que des lapins avec un peptide immunogène constitué d'un peptide synthétique de 21 acides-aminés, correspondant à la partie C-terminale codée par l'intron 4 des formes solubles HLA-G dont la séquence est SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL couplé à la protéine porteuse KLH.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- les figures 1, 2 et 3 sont des illustrations de la présence de différentes formes d'HLA-G dans le psoriasis,

- la figure 4 illustre l'activité inhibitrice des isoformes HLA-G sur des cellules *natural killer* (cellules NK) présentes dans le sang périphérique ; cette figure comporte en abscisse l'isoforme étudiée et en ordonnée, le pourcentage de lyse spécifique. Des cellules M8 (cellules de lignées de mélanome HLA classe I⁺, classe II⁻) transfectées soit avec le vecteur seul (M8-pCDNA) (Invitrogen), soit avec les vecteurs contenant l'ADNc codant HLA-G1 (M8-HLA-G1), l'ADNc codant HLA-G2 (M8-HLA-G2), l'ADNc codant HLA-G3 (M8-HLA-G3), l'ADNc codant HLA-G4 (M8-HLA-G4), sont utilisées comme cibles (T). Des cellules mononucléées de sang périphérique PBMC sont utilisées comme cellules effectrices (E). Les résultats sont exprimés en pourcentage de lyse, enregistré en 4h dans un test de libération du chrome 51 (⁵¹Cr) ;

- la figure 5 illustre l'activité inhibitrice des isoformes HLA-G sur une lignée de lymphocytes T CD8⁺ restreinte pour HLA-A2 présentant un peptide viral provenant de la matrice du virus de l'influenza, positions 58 à 66 ; cette figure comporte en abscisse l'isoforme étudiée et en ordonnée, le pourcentage de lyse spécifique ; le ratio cellules effectrices/cellules cibles est de 15:1.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

20 **EXEMPLE 1 : Production d'une forme soluble d'une isoforme d'HLA-G chez un baculovirus.**

L'isoforme soluble HLA-G5 dont la structure est composée de 3 domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ associée à la $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2M$), est issue d'un transcrit alternatif possédant un codon stop dans l'intron 4 du gène HLA-G.

25 La production d'une protéine HLA-G soluble recombinante fait appel à une co-infection de cellules d'insectes par un baculovirus contenant l'ADN complémentaire de la $\beta 2M$ et d'un autre baculovirus contenant l'ADNc de la chaîne α de HLA-G5. Cela permet en effet d'obtenir la forme physiologique HLA-G5/ $\beta 2M$.

1. Construction de vecteurs de transfert pour la recombinaison avec le virus BacTen.

a- Insertion du gène $\beta 2M$ dans un vecteur de transfert :

La séquence d'ADN codante $\beta 2M$ est insérée dans les sites BglII-KpnI du vecteur de transfert pTen12 (Quantum). Le clone recombinant est vérifié par digestion enzymatique, puis amplifié et stérilisé en vue de la cotransfection avec l'ADN du baculovirus BacTen linéarisé.

b- Insertion du gène codant HLA-G5 dans un vecteur de transfert :

La séquence codant la molécule HLA-G5 est insérée dans les sites BglII-KpnI du vecteur de transfert pTen12. Le clone recombinant est vérifié par digestion enzymatique, puis amplifié et stérilisé en vue de la cotransfection avec l'ADN du baculovirus BacTen (Quantum) linéarisé.

2. Construction de baculovirus recombinants.

La première étape consiste à obtenir des baculovirus recombinants HLA-G5A d'une part et $\beta 2M$ d'autre part. Les deux vecteurs de transfert portant les gènes $\beta 2M$ et HLA-G5A sont placés en présence de BacTen linéaire afin de cotransfecter les cellules d'insecte Sf9 en culture. Les surnageants de cotransfection sont récoltés et un clonage par plaques de lyse est réalisé pour isoler les clones des baculovirus recombinants. Afin de garantir la qualité de la construction, l'ADN des clones viraux est extrait et l'insertion du gène dans le bon *locus* viral est vérifiée par PCR. Six clones ont été obtenus pour chacune des constructions et chacun a servi à infecter à nouveau des cellules Sf9. Les surnageants de culture ainsi que les cellules ont ensuite été récupérés après centrifugation. Cette protéine est purifiée par immunoaffinité à l'aide des anticorps PAG5-6 (voir exemple 4). La structure de la protéine est vérifiée par *western blot* à la fois avec des anticorps PAG5-6 (anti-HLA-G5) et des anticorps B1G6 (Immunotech) (anti- $\beta 2M$) spécifiques respectivement de la forme soluble HLA-G5 et de la $\beta 2M$. Parmi les 6 clones produisant HLA-G5, et les 4 produisant $\beta 2M$, un a été sélectionné de chaque. Un clone HLA-G5 α et un clone $\beta 2M$ ont été utilisés pour coinfecter des cellules Sf9. Par analyse en *western blot* et immunoprécipitation avec un anticorps conformationnel W6/32 (IgG2a, anti-chaînes α de HLA de classe I associées à la $\beta 2$ -m (Sigma)), on peut montrer que le surnageant

de cette coinfection contient la protéine HLA-G5 associée à la β 2M ; elle présente ainsi une forme proche de la forme physiologique. Ces cellules Sf9 permettent donc d'obtenir de grandes quantités de protéine soluble HLA-G5.

EXEMPLE 2 : Mise en évidence de l'activité d'une composition comprenant une forme soluble d'HLA-G sur le psoriasis.

Les ARN messagers ont été extraits de biopsies congelées de 6 spécimens de peau lésée de psoriasis (Pso1-Pso-6, figures 1 et 3) et de 4 spécimens de peau normale (Peau saine 1-Peau saine 4, figures 2 et 3), reverse transcrits puis, à partir de ces ADN complémentaires, une amplification par PCR a été effectuée avec d'une part des amorces reconnaissant l'ensemble des transcrits HLA-G [amorce G.257 (exon 2) et 3G.U (extrémité 3' non-traduite)], utilisées pour l'amplification PCR des transcrits HLA-G correspondants aux différentes isoformes connues d'HLA-G (figures 1 et 2) et d'autre part des amorces spécifiques de la séquence HLA-G5 soluble, à savoir les amorces G.526 et G.i4b (figure 3).

De manière plus précise, les différentes amorces et sondes utilisées sont en conséquence les suivantes :

- G.526 (exon 3) et G3.U (3' UT) pour les isoformes G1, G4 et G5 ;
- G.526 (exon 3) et G.i4b (intron 4) pour l'isoforme G5 ;
- G.-3 (recouvrant partiellement les exons 2 et 4) et G3.U (3' UT) pour les isoformes G2 et G6 ;
- G.3-4 (recouvrant partiellement les exons 2 et 5) et G3.U (3' UT) pour l'isoforme G3.

Les sondes HLA-G spécifiques sont les suivantes :

- GR spécifique de l'exon 2, et
- G.I4 F (GAGGCATCATGTCTGTTAGG : spécifique de l'intron 4),

décrites dans P. MOREAU et al., C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences, 1995 ; 318 ; 837-42).

L'ADNc des cellules de choriocarcinome JEG-3, sont utilisés comme cellules contrôles pour les taux de transcription élevés. Les bandes HLA-G spécifiques sont révélées par hybridation avec la sonde GR-spécifique, localisée au niveau de l'exon 2. Les produits de la PCR, co-amplifiés au cours de la même réac-

tion, avec les amorces de la β -actine sont détectés sur la même membrane à l'aide d'une sonde β -actine.

Un taux faible, basal, d'ARN de HLA-G a été retrouvé dans 2 des 4 spécimens de peau normale provenant de plastie mammaire. Il s'agit toujours de la bande spécifique des isoformes HLA-G1-G5. Il n'y a pas d'ARN HLA-G dans les deux autres peaux saines. Dans les biopsies de peau lésée de 6 malades ayant un psoriasis, il existe un niveau transcriptionnel HLA-G plus élevé, en particulier concernant l'isoforme G1/G5 (figures 1 et 3). De même, le signal de l'isoforme HLA-G5 soluble est absent des 4 spécimens de peaux normales (figure 3), mais retrouvé chez 3 des 6 sujets présentant un psoriasis (figure 3).

Une étude immunohistochimique a été effectuée sur coupes congelées à l'aide de deux anticorps spécifiques : l'anticorps anti-HLA-G 87G spécifique de G1 et 6GS (GERAGHTY et al., précité), spécifique de l'isoforme soluble. En peau saine contrôle, il n'y a de marquage avec aucun des deux anticorps. Dans les peaux lésées de 6 malades ayant un psoriasis, il existe un marquage des cellules de l'infiltrat mononucléé du derme superficiel tant avec l'anticorps 87G (5/6) que 6GS (6/6).

Des cultures de kératinocytes provenant de peau saine ont été réalisées sur couche nutritive de fibroblastes 3T3 irradiés. L'expression d'HLA-G est absente par cytométrie de flux sur les kératinocytes normaux, mais inducible par l'interféron gamma. Par RT-PCR, il existe une stimulation du taux de l'ARN HLA-G par l'IL-10, l'hydrocortisone et l'interféron gamma.

Ces essais montrent que HLA-G intervient effectivement dans la régulation des phénomènes T dépendants responsables du psoriasis. Les résultats présentés ci-dessus montrent qu'il existe une expression accrue des ARN et de la protéine HLA-G dans le psoriasis par rapport à la peau saine et de la protéine HLA-G en peau lésée. Cette expression semble provenir des cellules de l'infiltrat mononucléé et est vraisemblablement due aux cellules mononucléées infiltrantes. Elle concerne tant l'isoforme prédominante HLA-G1, que l'isoforme HLA-G soluble ; ces résultats montrent le rôle de cette molécule dans la totalité du site lésionnel. HLA-G inhibant *in vitro* les fonctions de prolifération et de cytotoxicité T, sa présence accrue par rapport à la peau saine montre qu'une composition la contenant présente un rôle protecteur dans le psoriasis.

Dans les essais ci-dessus, la lignée cellulaire humaine de chorio-carcinome HLA-G-positif dénommée JEG-3 (ATCC) est cultivée dans un milieu DMEM (Sigma) supplémenté avec du sérum de veau foetal à 10%, inactivé à la chaleur, des antibiotiques et de la L-glutamine 2mM. Les lignées cellulaires ne
5 contiennent pas de mycoplasmes.

La RT-PCR est réalisée dans les conditions suivantes :

Les ARN messagers sont extraits à partir des biopsies précitées à l'aide du réactif RNA NOW (Biogentex, Inc.) conformément aux recommandations du fabricant. La qualité de l'ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose
10 dénaturant à 1,5%. Les ADNc sont préparés à partir de 10 µg d'ARN total, traités avec de la DNase I (Boehringer Mannheim) en utilisant une amorce oligo-(dT)₁₂₋₁₈ et la transcriptase inverse M-MLV (GIBCO-BRL). Les amplifications RT-PCR HLA-G spécifiques sont réalisées en utilisant les amorces précitées (G.257, 3G.U, G.526 et G.i4b).

15 **EXEMPLE 3 : Rôle du domaine extracellulaire $\alpha 1$ dans l'activité inhibitrice des HLA-G.**

- L'utilisation de cellules transfectées avec chacune des isoformes HLA-G1, -G2, -G3 ou -G4 en tant que cellules cibles face à des cellules immuno-compétentes *natural killer* présentes dans le sang périphérique permet de démontrer
20 que chacune des isoformes est capable d'inhiber l'activité cytotoxique des cellules *natural killer* (Fig. 4). Ces expériences ont été effectuées chez plus de dix donneurs volontaires sains et la significativité de l'inhibition exercée par chacune des isoformes a été validée par des tests statistiques (Fig. 4).

- Des tests similaires de cytotoxicité *in vitro* réalisés avec les mêmes
25 cellules cibles faces à des cellules T CD8+ restreintes par le CMH et spécifiques d'un peptide antigénique ont également démontré que chacune des isoformes HLA-G1, -G2, -G3 et -G4 inhibe de façon significative l'activité cytotoxique de ces cellules T (Fig. 5).

- Sur la base de la structure de l'isoforme HLA-G3 constituée uni-
30 quement du domaine extracellulaire $\alpha 1$ possédant toutes les propriétés inhibitrices décrites ci-dessus, on peut conclure à la fonctionnalité de ce domaine. Ce domaine

contient donc le motif fonctionnel de HLA-G et pourra donc être utilisé comme agent pharmacologique en vue d'une immunotolérance.

EXEMPLE 4 : Production d'un anticorps nommé PAG5-6 reconnaissant spécifiquement les formes solubles de HLA-G (HLA-G5 et HLA-G6) sous forme d'un
5 **sérum polyclonal obtenu chez le lapin.**

L'immunisation de lapins avec un peptide immunogène constitué d'un peptide synthétique de 21 acides-aminés, correspondant à la partie C-terminale codée par l'intron 4 des formes solubles HLA-G dont la séquence est SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL couplé à la protéine porteuse KLH, permet d'obtenir
10 un sérum polyclonal reconnaissant spécifiquement les formes solubles de HLA-G (HLA-G5 et HLA-G6) par les techniques d'immunoprécipitation, immunoempreinte (Western Blot) (Fig. 6), immunohistochimie et immunoenzymatique type ELISA. Ce sérum a été purifié sur colonne d'affinité (protéine G-Sépharose) et peut à la fois servir à la détection, la titration, et la purification des formes solubles HLA-G.

15 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Utilisation d'une composition essentiellement constituée d'au moins une forme soluble d'HLA-G et d'au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour la préparation d'un médicament pour le traitement des états pathologiques inflammatoires de la peau.

2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite forme soluble d'HLA-G est sélectionnée dans le groupe constitué par les isoformes d'HLA-G solubles comprenant au moins le domaine extracellulaire $\alpha 1$ et les formes solubilisées d'HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 ou HLA-G4.

3°) Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ladite composition comprend entre 0,1 et 5 $\mu\text{g/ml}$, de préférence entre 0,5 et 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de forme soluble d'HLA-G.

4°) Utilisation selon l'une quelconque de revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite composition comprend en outre de l'IL-10.

5°) Procédé de préparation d'une HLA-G soluble, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- co-infection de cellules d'insectes par un baculovirus contenant l'ADNc de la $\beta_2\text{M}$ et un autre baculovirus contenant la chaîne α d'une isoforme d'HLA-G soluble ;

- culture des cellules d'insectes transfectées, et

- récolte des surnageants et purification de l'isoforme d'HLA-G soluble exprimée.

6°) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite isoforme d'HLA-G soluble est purifiée à l'aide d'un anticorps spécifique des isoformes d'HLA-G soluble.

7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit anticorps est obtenu par immunisation de mammifères non-humains, notamment des lapins avec un peptide immunogène constitué d'un peptide synthétique de 21 acides aminés, correspondant à la partie C-terminale codée par l'intron 4 des formes solubles HLA-G dont la séquence est SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL couplé à la protéine porteuse KLH.

8°) Anticorps anti-HLA-G soluble, caractérisé en ce qu'il est obtenu par immunisation de mammifères non-humains, notamment des lapins avec un peptide immunogène constitué d'un peptide synthétique de 21 acides-aminés, correspondant à la partie C-terminale codée par l'intron 4 des formes solubles HLA-G dont la
5 séquence est SKEGDGGIMSVRESRSLSEDL couplé à la protéine porteuse KLH.

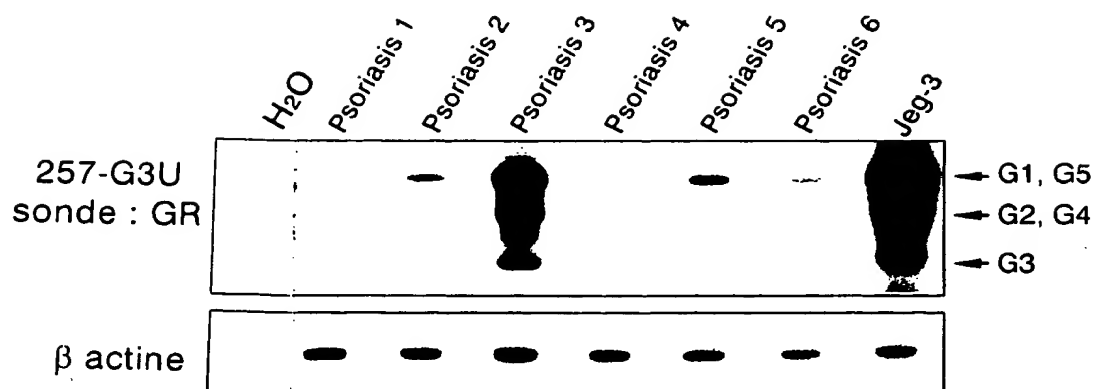


FIGURE 1

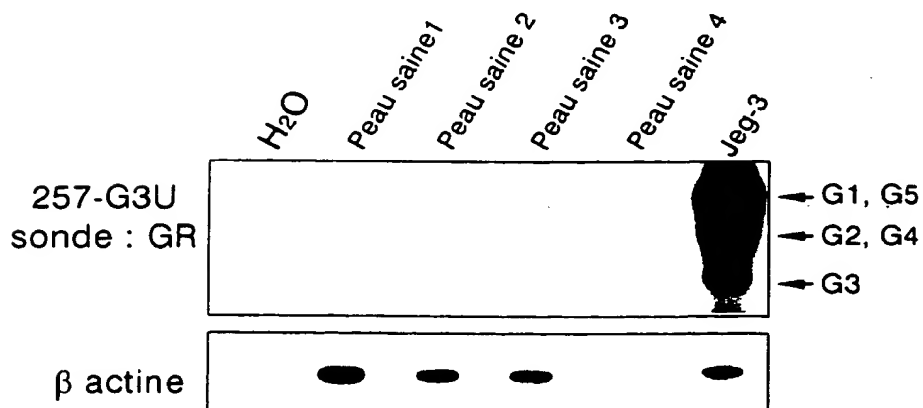


FIGURE 2

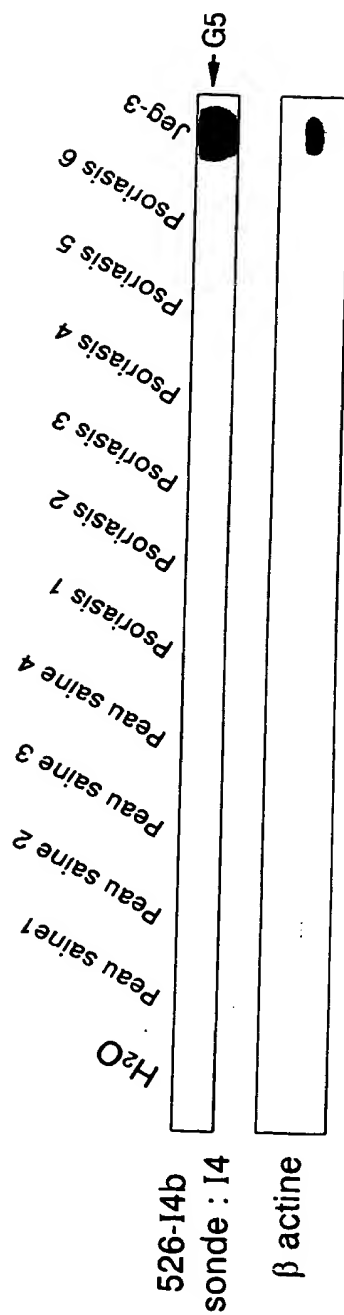
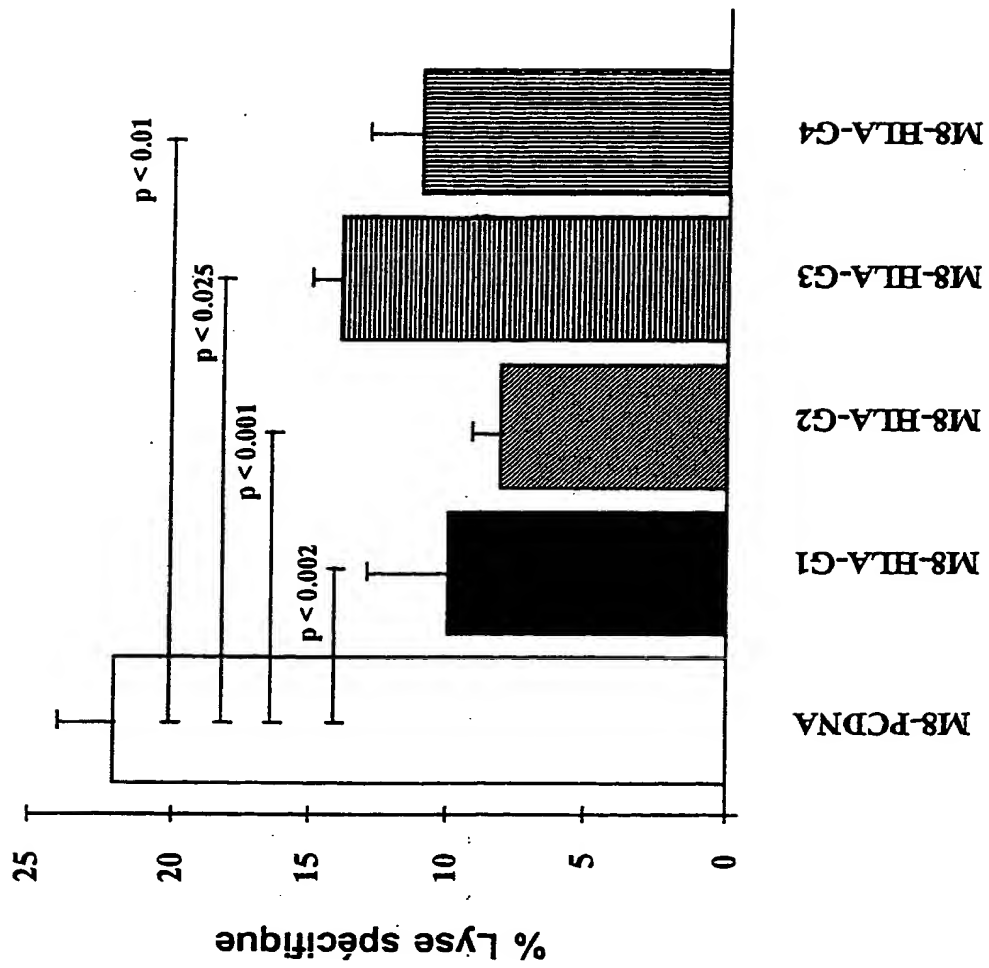
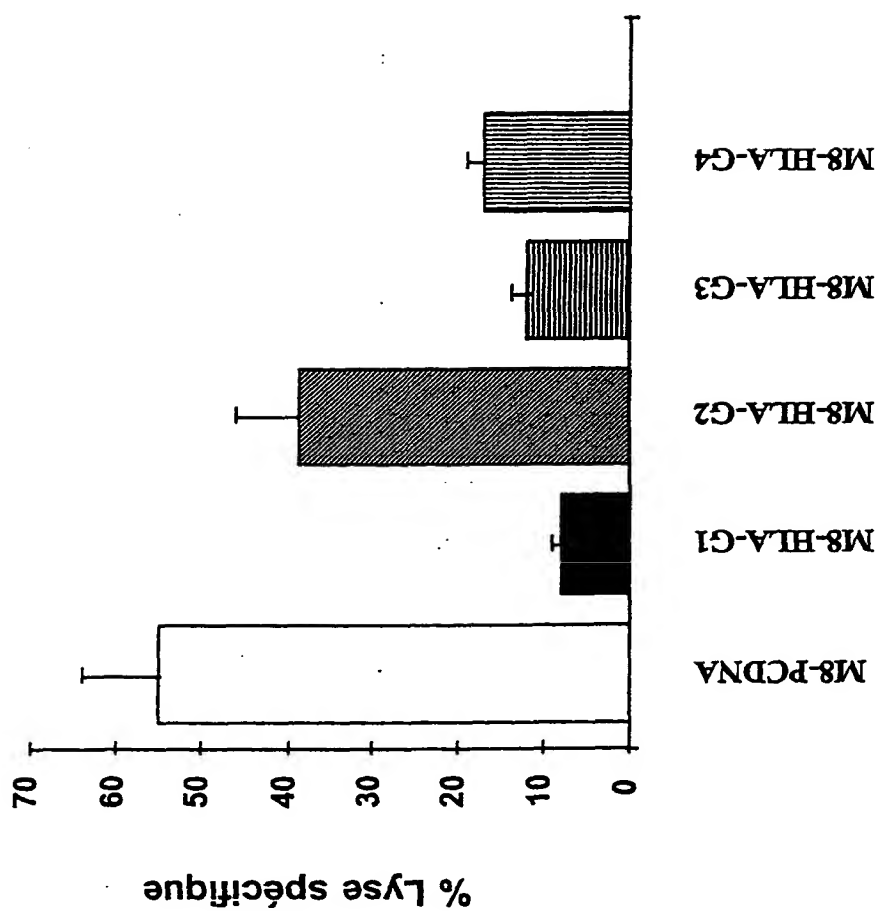


FIGURE 3



ratio effecteur : cible 50 : 1

FIGURE 4



ratio effecteur : cible 15 : 1

FIGURE 5

